

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intellectual  
Oficina internacional(43) Fecha de publicación internacional  
15 de Julio de 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2004/058297 A1(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: A61K 39/00,  
39/395(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/CU2003/000019(22) Fecha de presentación internacional:  
22 de Diciembre de 2003 (22.12.2003)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
2002/0338  
27 de Diciembre de 2002 (27.12.2002) CU(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo  
US): CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y  
BIOTECNOLOGÍA [CU/CU]; Avenida 31 entre 158  
y 190, Cubanacán, Playa, 10 600 Ciudad de La Habana  
(CU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): BOVER  
FUENTES, Eddy [CU/CU]; Calle B # 6 Comunidad  
Científica, 70 800 Camagüey (CU). BASULTO BAKER,  
Roberto [CU/CU]; Sociedad Patriótica # 6A entre, Padre  
Carmelo y C. Central, Rpto. Alturas del Casino, 70 300  
Camagüey (CU). PIMENTEL VÁZQUEZ, Eulogio  
[CU/CU]; Calle B #15 Comunidad Científica, 70 800  
Camagüey (CU). JUNCO BARRANCO, Jesús [CU/CU];  
Calle 2 #4 Comunidad Científica, 70 800 Camagüey (CU).  
FUENTES AGUILAR, Franklin [CU/CU]; Calle 3ra  
# 31 Comunidad Científica, 70 800 Camagüey (CU).  
ARTEAGA MORÉ, Niurka [CU/CU]; Calle B # 13 Co-  
munidad Científica, 70 800 Camagüey (CU). CALZADA  
AGUILERA, Lesvia [CU/CU]; Calle 3ra. # 31 Comu-  
nidad Científica, 70 800 Camagüey (CU). HERNÁNDEZDOMÍNGUEZ, Héctor [CU/CU]; Calle B # 20 Comu-  
nidad Científica, 70 800 Camagüey (CU). LÓPEZ SÁEZ,  
Yovisleidys [CU/CU]; Calle 1ra. Edificio 7 Apto. 7 entre  
B y C, Reparto Julio A. Mella, 70 600 Camagüey (CU).  
GUILLÉN NIETO, Gerardo, Enrique [CU/CU]; Línea  
No 6 e/ N y O, piso 4, Vedado, 10400 Ciudad de La Habana  
(CU). CHINEA SANTIAGO, Glay [CU/CU]; Calle 186  
#3115 entre 31 y 33 Apto. 4C, Playa, Ciudad Habana 12  
100, Cuba, 12 100 Ciudad Habana (CU).(74) Mandatario: POVEDA, MARCHECO, Argia; Avenida  
31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, 10600 Ciudad de La  
Habana (CU).(81) Estados designados (nacional): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,  
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Estados designados (regional): patente ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,  
SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.(54) Title: COMBINATIONS OF GROWTH- AND HORMONE-REGULATING FACTORS FOR THE TREATMENT OF NEO-  
PLASIA(54) Título: COMBINACIONES DE FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y HORMONAS PARA EL TRATA-  
MIENTO DE NEOPLASIAS(57) Abstract: The invention relates to the field of immunology, endocrinology and oncology and, in particular, the generation  
of a combined immune response to determined growth and hormone factors. A synergic effect, outlined herein, between factors  
regulating growth (EGF, TGF, VEGF) and hormones involved in the sexual hormone release cascade or reproduction (GnRH, LH,  
FSH) stimulates the anti-tumour response which is expressed as a reduction in the tumour mass and an increase in the survival time.(57) Resumen: La presente invención se refiere al campo de la inmunología, la endocrinología y la oncología, y en particular se  
basa en la generación de respuesta inmune, de forma combinada, hacia determinados factores de crecimiento y hormonas. Un efecto  
sinérgico entre factores reguladores del crecimiento (EGF, TGF, VEGF) y de hormonas involucradas en la cascada de liberación de  
hormonas sexuales, o de la reproducción: (GnRH, LH, FSH), descubierta aquí potencia la respuesta antitumoral, expresada como  
reducción de la masa tumoral y un aumento del tiempo de supervivencia.

## MEMORIA DESCRIPTIVA

### COMBINACIONES DE FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y HORMONAS PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS.

5

La presente invención está relacionada fundamentalmente con el campo de la inmunología, la endocrinología y la oncología, y en particular a composiciones farmacéuticas que incluyen una combinación de factores reguladores del crecimiento (EGF, TGF, VEGF) y de hormonas sexuales y/o aquéllas involucradas en la cascada de liberación de hormonas sexuales, o de la reproducción, que provocan la producción de respuesta auto inmune de forma combinada para el tratamiento de neoplasias.

#### Estado de la técnica Anterior

15 La Hormona Liberadora de Gonodotropinas ("Gonadotropin-Releasing Hormone" en inglés, abreviado GnRH), también conocida como Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante ("Luteinizing Hormone Releasing Hormone" en Inglés, abreviado LHRH), es una hormona peptídica hipotalámica, responsable de estimular la liberación de la hormona Luteinizante ("Luteinizing Hormone" en Inglés, abreviado LH) y Folículo Estimulante ("Follicle Stimulating Hormone" en Inglés, abreviado FSH) de la pituitaria anterior.

Además de la GnRH producida por el sistema hipotalámico, existen evidencias de la producción de GnRH en otros sitios del cerebro (Jennes L, Conn P.M., "Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in the rat brain". *Front Neuroendocrinol.* 1994, vol. 15, pp. 51-77), así como en células granulosas de ovario de ratas (Peng C. Fan N.C. Ligier M. Vaananen J. Leung P.C., "Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa-luteal cells". *Endocrinology* 1994, vol. 135, pp. 1740-1746), en células testiculares (Di Matteo L. Vallarino M. Pierantoni R., "Localization of GnRH molecular forms in the brain, pituitary, and testis of the frog, *Rana esculenta*". *J. Exp. Zool.* 1996, vol. 247, pp. 33-40), en la placenta humana (Gohar J. Mazor M. Leiberman J. R., "GnRH in pregnancy". *Arch. Gynecol. Obstet.* 1996, vol. 259, pp. 1-6), en el sistema inmune (Jacobson J.D. Crofford L.J. Sun L. Wilder R.L., "Cyclical expression of GnRH and GnRH receptor mRNA in

lymphoid organs". *Neuroendocrinology* 1998, vol. 67, pp. 117-125) y en glándula pituitaria (Bauer T.W. Moriarty C.M. Childs G.V., "Studies of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the rat anterior pituitary". *J. Histochem. Cytochem.* 1981, vol. 29, pp. 1171-1178).

- 5 Es bien conocido que la gonadectomía constituye una intervención terapéutica necesaria en el tratamiento de tumores dependientes de esteroides gonadales. Los análogos de GnRH pueden ejercer su actividad antitumoral no solo a través de la castración química, sino también por efecto directo sobre las células tumorales (Couillard S. Labrie C. Belanger A. Candas B. Pouliot F. Labrie F. "Effect of dehydroepiandrosterone and the antiandrogen EM-800 on growth of human ZR-75-1 breast cancer xenografts". *J. Nat. Cancer Inst.*, 1998, May 20, pp. 772-778; Kolle S. et al.: "Expression of growth hormone receptor in human prostatic carcinoma and hyperplasia". *Int. J. Oncol.*, 1999, vol. 14, No. 5, pp. 911-916).

- 10 Se ha reportado además, que un antagonista de GnRH (MZ-4-71) es capaz de suprimir el crecimiento de líneas celulares de cáncer de próstata andrógeno independientes PC-3, DU-145 y Dunning AT-1 (A Jungwirth et al.: "Inhibition of in vivo proliferation of androgen-independent prostate cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone". *British Journal of Cancer*, 1997, vol. 75, No. 11, pp. 1585-1592).

- 20 La línea celular Dunning R3327-G ha sido utilizada ampliamente para diferentes estudios, generalmente asociados al tratamiento de tumores prostáticos, y en la actualidad constituye un modelo establecido. El receptor de EGF (EGF-R) se ha encontrado en modelos de tumores prostáticos Dunning R3327 sensibles a andrógenos (Damber JE, Bergh A, Assarsson B, Gåfvels M. "Epidermal growth factor receptor content in rat prostatic adenocarcinoma: effects of endocrine treatment", *Urol Res* 1995; vol. 23, No.2, pp. 119-25). Se ha sugerido además, que en la sublínea Dunning R3327-G, la expresión del receptor de EGF está coordinadamente bajo el control androgénico (Coordinate loss of growth regulatory factors following castration of rats carrying the Dunning R3327 G prostatic tumor. *Clin Physiol Biochem* 1992; vol. 9, No.2, pp. 47-50).

30 El Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermal Growth Factor en inglés, abreviado EGF) es un polipéptido de 53 aminoácidos, con un peso molecular de alrededor de 6,045 D, que estimula la proliferación de células epiteliales y mesenquimales tanto *in vitro* como *in vivo* (Cohen S., Carpenter G., "Human Epidermal Growth factor:

Isolation and Chemical and Biological Properties", *PNAS USA* 1975, vol. 72, pp. 1317). Su acción es desarrollada fundamentalmente a través de receptores específicos en la membrana de dichas células. El EGF fue aislado y purificado por primera vez de glándulas submaxilares murinas (Cohen S. *J. Biol. Chem.* 1962, vol. 237, No. 1, pp. 555). Posteriormente se obtuvo una molécula similar de la orina humana (Cohen S. "Human Epidermal Growth factor: Isolation and Chemical and Biological Properties", *PNAS USA* 1975, vol. 72, pp. 1317).

La acción bio-reguladora del EGF es ejercida a través de un receptor de membrana (EGF-R), una glicoproteína de alrededor de 170 KD, cuyo gen ha sido clonado y secuenciado. El dominio intracelular del receptor está asociado con la actividad de una proteína tirosino kinasa específica, que muestra homología estructural al producto oncogen *v-erb-B* mostrando cierta relación hacia los procesos de transformaciones malignas (Helding C. H. *Cell* 1984, vol. 37, pp. 9-20).

La presencia del EGF-R en células de tumores ha probado ser una indicación de un pronóstico reservado en el cáncer de mama humano. Aproximadamente el 40% de los tumores de mama muestran sitios de unión específica de alta afinidad por el EGF (M.A. Rios et al.: "Receptors for Epidermal Growth Factor and Estrogen as Predictors of Relapse in Patients with Mammary Carcinoma". *Anticancer Research* 1988, vol. 8, pp. 173-176). Existe también una correlación inversa con la presencia de receptores de estrógenos señalando al EGF-R como un marcador de diferenciación o como un indicador de la capacidad potencial de proliferación de células malignas (Pérez R., Pascual M. R., Macías A., Lage A., *Breast Cancer Research and Treatment* 1984, vol. 4, pp. 189-193).

Estudios previos desarrollados en el modelo del tumor ascítico de Ehrlich en ratones Balb/C, demostraron el efecto inhibitorio in vivo del EGF (Lombardero J., et al. *Neoplasma* 1987, vol.33, pp. 4), sugiriendo la posibilidad de considerar esta molécula como un modificador de la respuesta biológica.

Una composición vacunal que contiene al EGF autólogo acoplado a una proteína portadora que inhibe el crecimiento de tumores dependientes de EGF a través de un efecto autoinmune, sin efectos colaterales, ha sido desarrollada (US 5,894,018: Vaccine composition comprising autologous epidermal growth factor or fragment or derivative thereof having anti-tumor activity and use thereof in the therapy of malignant diseases).

- En estudios previos se ha reportado que el tumor Dunning expresa altos niveles de ARNm para el factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular Endothelial Growth Factor en inglés, abreviado VEGF) y sus receptores comparados con la próstata ventral (Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the ventral prostate and Dunning R3327 PAP adenocarcinoma before and after castration, *Prostate* 1998, vol. 36, No. 2, pp. 71-79). Ensayos en modelos animales han mostrado que la privación androgénica puede conllevar a la regresión vascular y que el VEGF puede ser regulado por andrógenos. En el cáncer de próstata humano, la producción constitutiva de VEGF por el epitelio glandular fue suprimida como consecuencia de una terapia de ablación androgénica. La pérdida de VEGF conllevó a la apoptosis selectiva de las células endoteliales en vasos desprovistos de células periendoeliales (Laura E. et al.: "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal". *J. Clin. Invest.* 1999, vol. 103, No. 2, pp. 159-165).
- El VEGF es un mitógeno angiogénico y vasculogénico específico de células endoteliales y también juega su papel en la vascularización patológica, la cual se asocia a un número de patologías clínicas, incluyendo el cáncer y la artritis reumatoidea. El VEGF es un homodímero glicosilado unido por enlaces disulfuros y es expresado en diferentes isoformas (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> y VEGF<sub>206</sub>) con tallas que varían en un rango desde 121 hasta 206 residuos en humanos (Yves A. Muller, et al.: "The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding". *Structure* 1997, vol. 5, No. 10, pp. 1325-1338).
- Las células tumorales por lo general muestran dependencia altamente reducida de estimulación de crecimiento exógeno y son capaces de generar muchas de sus señales propias de crecimiento. Esta independencia de señales, derivadas exógenamente, daña un mecanismo homeostático críticamente importante, que opera normalmente para asegurar el comportamiento correcto de varios tipos de células dentro de un tejido.
- Para alcanzar su autonomía en señales de crecimiento, las células han creado mecanismos que alteran las señales de crecimiento extracelular, de transductores transcelulares de esas señales o del circuito intracelular que traduce esas señales en acción (Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg: "The Hallmarks of Cancer (Review)". *Cell* 2000, vol. 100, pp. 57-70). Mientras la mayoría de los factores de

crecimiento son producidos por un tipo de células para estimular la proliferación de otras (proceso de señalización heterotípico), muchas células de cáncer adquieren la habilidad de sintetizar factores de crecimiento para los cuales ellas son respondedoras, creando un lazo de retroalimentación positiva (estimulación autocrina).

5 Los receptores para determinados factores de crecimiento, que generalmente portan actividad tirosino kinasa en sus dominios citoplasmáticos, están sobre-expresados en muchos tipos de células cancerosas y como consecuencia desarrollan una hiper-respuesta a concentraciones normales de los mismos. La sobre-expresión de  
10 receptores para factores de crecimiento, puede elicitar señalización independiente de ligandos. La señalización independiente de ligandos puede ser alcanzada también por alteraciones estructurales de los receptores (el receptor de EGF puede perder parte de su dominio citoplasmático y señalizar constitutivamente).

La cascada SOS-Ras-Raf-MAPK juega el papel central en la señalización por la  
15 acción de factores de crecimiento. El 25% de tumores humanos presentan problemas en la regulación de la expresión de proteínas Ras, aunque se supone que las rutas de señalización del crecimiento sufren alteraciones en todos los tumores humanos (casi la mitad de los carcinomas de colon humanos portan oncogenes ras mutados y se piensa que los restantes portan defectos en otros  
20 componentes de las rutas de señalización).

Las células normales, tales como fibroblastos y células endoteliales, pueden jugar un papel decisivo en la proliferación de las células tumorales. En un tejido normal las células son incitadas a crecer a través de las señales (paracrinas) de sus vecinas, o a través de señales sistémicas (endocrinas), por tanto, para explicar la  
25 proliferación de células tumorales hay que tener en cuenta que la señalización heterotópica entre los diversos tipos de células dentro del tumor es tan importante como los mecanismos autónomos antes mencionados. En ese sentido, el oxígeno y los nutrientes suministrados por la vasculatura son cruciales para las funciones y supervivencia de las células tumorales.

30 La habilidad de inducir angiogénesis sostenida parece adquirirse en uno o varios pasos discretos durante el desarrollo de tumores a través de un cambio angiogénico del estado vascular enquistado. La neovascularización es un pre-requisito para la expansión clonal asociada con la formación de tumores macroscópicos.

Se ha encontrado que el efecto mitogénico de factores de crecimiento en líneas celulares puede ser contrarrestado por análogos de GnRH, indicando una interacción de la GnRH con la ruta mitogénica de transducción de señales. Esta hipótesis fue corroborada por la demostración de la inhibición de la actividad tirosino

5      kinasa, inducida por factores de crecimiento en células tumorales humanas de ovarios y endometrio por agonistas de GnRH, la cual se debió en parte a la activación GnRH-inducida de la fosfatasa fosfotirosina.

Se ha asociado el tratamiento con análogos de GnRH a una reducción marcada de receptores para factores de crecimiento (EGF; factor 1 de crecimiento de tipo

10     insulina, IGF-1) en membrana de células tumorales; así como la disminución dramática de los niveles de ARNm para el EGF-R en tumores. Se ha reportado además actividad anti-proliferativa y cambios en la expresión de receptores para estrógenos y andrógenos en determinadas líneas tumorales.

Los avances en las investigaciones relacionadas con el cáncer durante más de un

15     cuarto de siglo, han propiciado la acumulación de indiscutibles evidencias, de que la tumorigénesis es un proceso dinámico de múltiples pasos. El vasto catálogo de genotipos de células malignas es una manifestación de alteraciones esenciales en la fisiología de las células, dichas alteraciones rigen colectivamente el crecimiento maligno de tejidos en los distintos tipos de tumores. Por lo tanto un importante

20     problema de la terapia del cáncer aun no resuelto, es conseguir la modulación de la respuesta inmune por la vía activa o pasiva.

### **Explicación de la Invención**

La presente invención resuelve el problema antes mencionado, empleando una

25     nueva combinación farmacéutica que incluye factores reguladores del crecimiento (EGF, TGF, VEGF) y hormonas sexuales y/o aquéllas involucradas en la cascada de liberación de hormonas sexuales, o de la reproducción (GnRH, LH, FSH). Dicha combinación es útil para el tratamiento de neoplasias y dependiendo de las circunstancias los ingredientes activos de la combinación pueden administrarse

30     simultánea, separada o secuencialmente.

En estudios preclínicos realizados, la generación de respuesta inmune combinada hacia los factores de crecimiento y hormonas antes mencionados, ha permitido obtener mejores resultados que los observados cuando se genera respuesta inmune hacia estos factores y hormonas de forma independiente. Estos resultados

proporcionan evidencias de que este acercamiento constituye una vía más efectiva para el tratamiento de pacientes con neoplasias de diferentes orígenes ya que se potencia la respuesta antitumoral, expresada como reducción de la masa tumoral y el aumento del tiempo de supervivencia.

- 5 Mas particularmente la invención se refiere a combinaciones farmacéuticas para el tratamiento de neoplasias, mediante administración simultánea, separada o secuencial, las cuales comprenden un compuesto A y un compuesto B, donde A y B son seleccionadas del grupo de moléculas consistentes en:

A: a.1. GnRH, o sus análogos, o anticuerpos anti-GnRH, o el receptor de GnRH

- 10 (GnRH-R) o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o anticuerpos anti-GnRH-R, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

- a.2. Gonadotropinas naturales o recombinantes, o sus análogos, o sus variantes mutadas, acopladas o no a una proteína portadora inmunopotenciadora, anticuerpos anti-Gonadotropinas hipofisarias, sus fragmentos Fabs, scFV,
- 15 humanizados o no.

- a.3. Receptores de Gonadotropinas hipofisarias, o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

- a.4. Anticuerpos anti-receptor de Gonadotropinas hipofisarias, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- 20

B: b.1. EGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de EGF o análogos de EGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

- b.2. Anticuerpos anti-EGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.

- 25 b.3. Receptor de EGF (EGF-R), o sus variantes mutadas o péptidos derivados acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

- b.4. Anticuerpos anti receptor de EGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.

- b.5. VEGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de VEGF o análogos de VEGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 30

- b.6. Anticuerpos anti-VEGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.

- b.7. Receptores de VEGF, o sus variantes mutadas o péptidos derivados de los receptores de VEGF acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 5 b.8. Anticuerpos anti receptor de VEGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.9. TGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de TGF o análogos de TGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- b.10. Anticuerpos anti-TGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- 10 b.11. Receptor de TGF (TGF-R), o sus variantes mutadas o péptidos derivados
- En una realización preferida, las combinaciones farmacéuticas que incluyen las moléculas de los grupos A ó B son acopladas a la proteína portadora inmunopotenciadora mediante conjugación o mediante la formación de proteínas quiméricas y más específicamente dentro de las moléculas del grupo A el péptido
- 15 análogo de GnRH con la secuencia pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly.
- En otra materialización de la invención la proteína portadora inmunopotenciadora seleccionada puede ser una de las proteínas de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* P1 y P64.o un epítotope T helper del toxoide tetánico (TT).
- Asimismo la invención refiere una combinación farmacéutica donde la proteína
- 20 conjugada o quimérica es una de las variantes siguientes:
- (b) GnRH unida a una proteína portadora y a EGF.
  - (c) GnRH unida a una proteína portadora y a VEGF.
  - (d) GnRH unida a una proteína portadora y a TGF.
  - (e) GnRH unida a una proteína portadora a EGF y a TGF.
  - 25 (f) GnRH unida a una proteína portadora a VEGF y a EGF.

Esta invención proporciona también un método para la generación de respuesta inmune combinada el cual comprende el tratamiento con las combinaciones terapéuticas definidas en la invención, las cuales pueden ser aplicadas de forma simultánea, separada o secuencial.

30 La invención se describe más detalladamente a través de los siguientes procedimientos

**Obtención de una preparación inmunogénica, que contiene GnRH mutada acoplada a un epítotope T-helper del toxoide tetánico (D3-1), como uno de los componentes para preparaciones combinadas.**

Para alcanzar una respuesta de anticuerpos contra la GnRH se inmuniza con un péptido análogo a GnRH conjugado con una proteína portadora (*Vacuna para la inmunocastración de mamíferos, EP 0 959 079*). El péptido análogo de GnRH (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly) y la proteína portadora (un epítotope T-helper del toxoide tetánico) fueron sintetizados químicamente usando dos residuos de glicina como separadores, por el método de fase sólida y la estrategia Boc/Bzl usando resina de "4-methyl-benzhydrylamine" (MBHA - 0.75 mmol/g, BACHEM, Swiss).

La respuesta humoral contra la GnRH puede obtenerse mediante la inmunización activa con GnRH natural o cualquiera de sus análogos acoplados a una proteína portadora. Por otra parte los análogos de GnRH, agonistas o antagonistas, pueden ser usados como tales en preparaciones combinadas, lográndose también un efecto sinérgico de reducción de la masa tumoral debido a que del mismo modo interrumpen o dañan la señalización a través de la proteína G en las células que portan sus receptores. Anticuerpos anti-GnRH pueden utilizarse además como componentes en composiciones combinadas para generar una respuesta inmune pasiva. Las gonadotropinas hipofisarias hormona luteinizante (LH) y folículoestimulante (FSH) pudieran también ejercer un efecto sinérgico en determinados tipos de tumores si se combinan con factores de crecimiento para producir respuesta autoinmune.

**Obtención de una preparación inmunogénica, que contiene al Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (hrEGF) acoplado a una proteína portadora, como uno de los componentes para preparaciones combinadas.**

Una solución de Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante hrEGF (National Medicament Register Office from Cuba, HEBERMIN, No.1266) en PBS/MgCL<sub>2</sub> 10 mM, se mezcla con una solución de la proteína portadora (P64 recombinante; proteína de membrana exterior de *Neisseria meningitidis*) en el mismo solvente, en una relación de 1 a 5 moles de hrEGF por mol de proteína. Posteriormente se adiciona glutaraldehído 0.05% hasta una concentración final de 0.05 a 0.1 %. La mezcla se incuba por un período de 1 a 3 horas a temperatura ambiente y se dializa en PBS/ MgCL<sub>2</sub> 10mM con al menos 3 cambios de la solución de diálisis (Vaccine composition comprising autologous epidermal growth factor or a

fragment or a derivative thereof having anti-tumor activity and use thereof in the therapy of malignant diseases, US 5,894,018).

La respuesta humoral hacia el EGF puede lograrse también mediante la inmunización con péptidos de EGF o de su receptor acoplados a una proteína portadora inmunopotenciadora, o de forma pasiva, suministrando directamente anticuerpos anti-EGF o anti receptor de EGF.

El EGF comparte cerca del 30 % de su secuencia con el Factor de Crecimiento Transformante (Transforming Growth Factor en inglés, abreviado TGF) y compite con él por los mismos sitios de unión en receptores de membrana. Además, se han reportado grandes cantidades de complejos *TGF alfa / receptor de EGF* en diferentes tipos de tumores humanos. Es por tanto evidente, que la respuesta humoral hacia el TGF es importante en la oncogénesis, y que es igualmente importante en el sinergismo que se describe para el EGF.

**Obtención de una preparación inmunogénica, que contiene al Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular humano (hVEGF) acoplado a una proteína portadora, como uno de los componentes para preparaciones combinadas.**

La respuesta humoral contra el VEGF es alcanzada inmunizando con hVEGF conjugado con una proteína portadora (KLH, Keyhole limpet haemocyanin) (hVEGF-KLH). La conjugación de la isoforma hVEGF<sub>121</sub> a KLH se realizó utilizando el proceso de acoplamiento de la carbodiimida soluble.

La respuesta humoral hacia el VEGF puede lograrse también mediante la inmunización con péptidos de VEGF o de su receptor acoplados a una proteína portadora inmunopotenciadora, o de forma pasiva, suministrando directamente anticuerpos anti-VEGF o anti receptores de VEGF.

**Obtención de una preparación inmunogénica combinada de GnRH y hrEGF.**

La preparación inmunogénica combinada se obtuvo mezclando 750 µg de D3-1 y 250 µg de hrEGF-P64 en un volumen final de 0.5 ml.

**Obtención de una preparación inmunogénica combinada de GnRH y hVEGF.**

La preparación inmunogénica combinada se obtuvo mezclando 750 µg de D3-1 y 100 µg de hVEGF-KLH en un volumen final de 0.5 ml.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la evaluación del tiempo de supervivencia de ratas Copenhagen implantadas con la línea tumoral Dunning R3327-G sometidas a diferentes tratamientos.

5

### Exposición detallada de modos de realización / Ejemplos

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

#### 1. Implante de la línea tumoral R3327-G en ratas Copenhagen.

10 Ratas Copenhagen de 9-12 semanas (aproximadamente 100 g de peso corporal) fueron implantadas con la línea celular Dunning R3327-G, utilizando una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células por animal, en medio de implante (medio de cultivo RPMI 1640, libre de suero en un volumen de 0.5 ml) en la zona laxa de los flancos. La eficiencia del prendimiento alcanzada fue del 100% de los animales a los 90 días.

#### 15 2. Evaluación del tiempo de supervivencia, como criterio de actividad antitumoral, de ratas implantadas con la línea tumoral Dunning R3327-G bajo diferentes tratamientos.

Para el experimento se confeccionaron 8 grupos, de 10 animales cada uno, con ratas Copenhagen implantadas de la forma que se describe anteriormente.

Grupos experimentales:

- 20 1. Animales placebos (inmunizados con PBS en adyuvante oleoso).
  - 2. Animales castrados quirúrgicamente.
  - 3. Animales tratados con DES (dietilestilbestrol).
  - 4. Animales inmunizados con el péptido D3-1 (GnRHm1-TT).
  - 5. Animales inmunizados con hrEGF-P64.
  - 25 6. Animales inmunizados con hVEGF-KLH.
  - 7. Animales inmunizados con una preparación combinada de D3-1 + hrEGF-P64.
  - 8. Animales inmunizados con una preparación combinada de D3-1 + hVEGF-KLH.
- El esquema de inmunización utilizado en el tratamiento incluyó 7 dosis (3 dosis antes del implante y 4 dosis posterior al implante) administradas quincenalmente de:
- 30 750 µg de D3-1, 250 µg de hrEGF-P64, 100 µg de hVEGF-KLH y las combinaciones de D3-1 + hrEGF-P64 y D3-1 + hVEGF-KLH en un volumen de 0.5 ml en adyuvante oleoso (se utilizó adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y adyuvante Incompleto de Freund en estimulaciones posteriores), por vía subcutánea en 4 sitios a ambos lados de la columna vertebral. En las combinaciones se

mantuvo la misma dosis de cada antígeno que la suministrada en los tratamientos independientes.

El tratamiento con DES se realizó en días alternos 3 veces por semana a razón de 1mg/kg/día durante el tiempo que duró el experimento y comenzó una vez que se  
5 inocularon las células.

Las inmunizaciones comenzaron entre 30 y 45 días antes del procedimiento de implante del tumor y se prolongaron hasta completar un total de 7 inmunizaciones, de modo que la respuesta humoral en ensayos ELISA para cada uno de los antígenos, expresada en títulos de anticuerpos, estuviera por encima del valor de  
10 corte para cada antígeno, antes de que se inocularan las células tumorales.

La evaluación del efecto de los tratamientos se realizó 1 vez por semana durante el período experimental (13 meses). El efecto fue evaluado como el tiempo de supervivencia de los animales en cada grupo experimental. Los datos se muestran en la figura No. 1.

15 **3. Evaluación de la reducción del tumor, como criterio de actividad antitumoral, en ratas implantadas con la línea tumoral Dunning R3327-G bajo diferentes tratamientos:**

Para el experimento se confeccionaron 8 grupos, de 10 animales cada uno, con ratas Copenhagen implantadas de la forma que se describe anteriormente.

20 **Grupos experimentales:**

1. Animales placebos (inmunizados con PBS en adyuvante oleoso).
  2. Animales castrados quirúrgicamente.
  3. Animales tratados con DES (dietilestilbestrol).
  4. Animales inmunizados con el péptido D3-1 (GnRHm1-TT).
  - 25 5. Animales inmunizados con hrEGF-P64.
  6. Animales inmunizados con hVEGF-KLH.
  7. Animales inmunizados con una preparación combinada de D3-1 + hrEGF-P64.
  8. Animales inmunizados con una preparación combinada de D3-1 + hVEGF-KLH.
- El esquema de inmunización utilizado en el tratamiento (igual que el anterior) incluyó  
30 7 dosis (3 dosis antes del implante y 4 posterior al implante) administradas quincenalmente de: 750 µg de D3-1, 250 µg de hrEGF-P64, 100 µg de hVEGF-KLH y sus combinaciones en un volumen de 0.5 ml en adyuvante oleoso. (se utilizó adyuvante completo de Freund en la primera inmunización y adyuvante Incompleto

de Freund en estimulaciones posteriores), por vía subcutánea en 4 sitios a ambos lados de la columna vertebral. En las combinaciones se mantuvo la misma dosis de cada antígeno que la suministrada en los tratamientos independientes.

El tratamiento con DES se realizó en días alternos 3 veces por semana a razón de 1mg/kg/día durante el tiempo que duró el experimento y comenzó una vez que se

La evaluación del experimento se realizó al sacrificio (3 meses después de realizado el implante de la línea tumoral). Para evaluar el efecto de cada tratamiento, el tumor fue resecado y pesado en balanza técnica. El efecto del tratamiento ( $E_{\text{Tratamiento}}$ ) se consideró como la unidad menos la relación de la media del peso de los tumores en los animales tratados ( $P_{\text{Tratamiento}}$ ) y la media del peso de los tumores en los animales placebos ( $P_{\text{Placebo}}$ ):

$$E_{\text{Tratamiento}} = 1 - (P_{\text{Tratamiento}} / P_{\text{Placebo}}) \quad (1)$$

El efecto esperado ( $E_{\text{Teórico}}$ ) en el caso de las preparaciones de doble combinación puede calcularse para el caso de que ambos efectos no sean mutuamente excluyentes (Caridad W. Guerra Bustillo, Ernesto Menéndez Acuña, Rolando Barrero Moreña, Esteban Egaña Morales: "Estadística", Editorial Pueblo y Educación, 1989) según la formula:

$$E_{\text{Teórico}} = E_{T1} + E_{T2} - (E_{T1} * E_{T2}) \quad (2)$$

donde:  $E_{T1}$  es el Efecto del tratamiento 1 y  $E_{T2}$  es el efecto del tratamiento 2.

Como se puede apreciar en la Tabla No 1, el efecto experimental obtenido para las combinaciones (preparaciones combinadas) es superior al efecto teórico o esperado, quedando demostrado el efecto sinérgico de estas combinaciones en la reducción de la masa tumoral.

**Tabla No 1:** Efecto de los diferentes tratamientos, en ratas Copenhagen implantadas con la línea tumoral Dunning R3327-G, al sacrificio después de 3 meses de la primera inmunización.

Tratamiento	Peso del tumor (g) (Media de 10 animales)	Efecto del Tratamiento	Efecto teórico
Castrados	9,20	0,707	-
Placebo	31,41	0,000	-
DES	12,66	0,597	-
D3-1	19,31	0,385	-
hrEGF-P64	25,43	0,190	-
hVEGF-KLH	21,72	0,309	-
D3-1 + hEGFr-P64	12,14	0,613	0,502
D3-1 + hVEGF-KLH	10,87	0,654	0,575

5

10

**REIVINDICACIONES****COMBINACIONES DE FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y HORMONAS PARA EL TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS.**

5

1. Combinaciones farmacéuticas para el tratamiento de neoplasias, mediante administración simultánea, separada o secuencial, caracterizada porque incluye un compuesto A y un compuesto B, donde A y B son seleccionadas del grupo de moléculas consistentes en:

10 A:

- a.1. GnRH, o sus análogos, o anticuerpos anti-GnRH, o el receptor de GnRH (GnRH-R) o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o anticuerpos anti-GnRH-R, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

15

- a.2. Gonadotropinas naturales o recombinantes, o sus análogos, o sus variantes mutadas, acopladas o no a una proteína portadora inmunopotenciadora, anticuerpos anti-Gonadotropinas hipofisarias, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.

20

- a.3. Receptores de Gonadotropinas hipofisarias, o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

- a.4. Anticuerpos anti-receptor de Gonadotropinas hipofisarias, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.

B:

25

- b.1. EGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de EGF o análogos de EGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

- b.2. Anticuerpos anti-EGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.

- b.3. Receptor de EGF (EGF-R), o sus variantes mutadas o péptidos derivados acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

30

- b.4. Anticuerpos anti receptor de EGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.

- b.5. VEGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de VEGF o análogos de VEGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.

- b.6. Anticuerpos anti-VEGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.7. Receptores de VEGF, o sus variantes mutadas o péptidos derivados de los receptores de VEGF acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 5 b.8. Anticuerpos anti receptor de VEGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.9. TGF natural o recombinante o sus variantes mutadas, o péptidos derivados, o péptidos miméticos de TGF o análogos de TGF, acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 10 b.10. Anticuerpos anti-TGF, sus fragmentos Fabs, scFV, humanizados o no.
- b.11. Receptor de TGF (TGF-R), o sus variantes mutadas o péptidos derivados acoplados o no a una proteína portadora inmunopotenciadora.
2. Combinaciones de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizadas porque las moléculas de los grupos A ó B son acopladas a la proteína portadora
- 15 inmunopotenciadora mediante conjugación o mediante la formación de proteínas quiméricas.
3. Combinaciones de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque el péptido análogo de GnRH tiene la secuencia pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Pro-Leu-Arg-Pro-Gly, acoplada a una proteína portadora inmunopotenciadora.
- 20 4. Combinaciones de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque la proteína portadora inmunopotenciadora es seleccionada de las proteínas de la membrana externa de Neisseria meningitidis P1 y P64.
5. Combinaciones de acuerdo con la reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque la proteína portadora inmunopotenciadora es un epítipo T helper del toxoide
- 25 tetánico (TT).
6. Combinaciones de acuerdo con la reivindicaciones 1 y 2 caracterizadas porque la proteína conjugada o quimérica es una de las variantes siguientes:
- (a) GnRH unida a una proteína portadora y a EGF.
- (b) GnRH unida a una proteína portadora y a VEGF.
- 30 (c) GnRH unida a una proteína portadora y a TGF.
- (d) GnRH unida a una proteína portadora a EGF y a TGF.
- (e) GnRH unida a una proteína portadora a VEGF y a EGF.

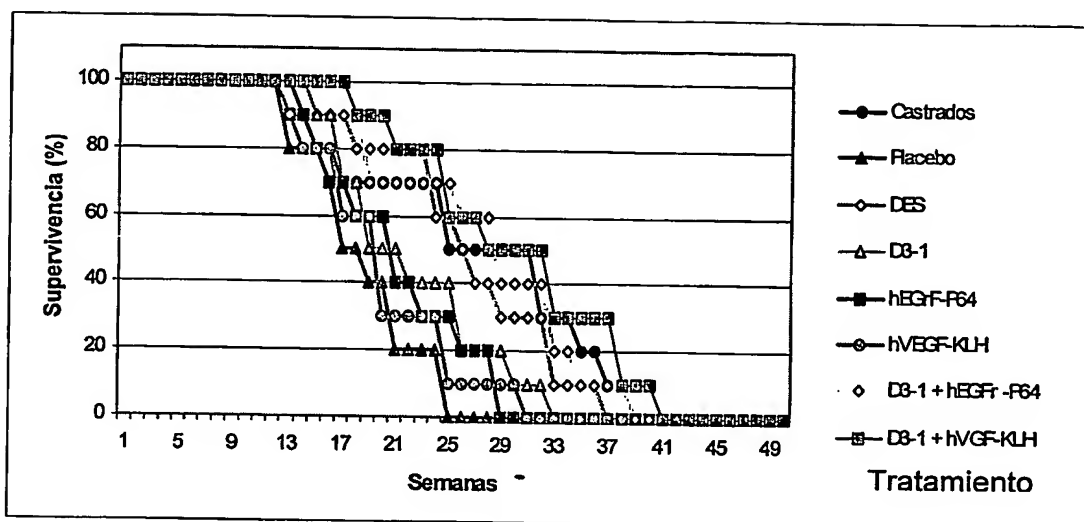
7. Un método para la generación de respuesta inmune combinada caracterizado porque comprende el tratamiento con una de las combinaciones terapéuticas definidas en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6.
8. Un método según la reivindicación 7 caracterizado porque las combinaciones  
5 pueden ser aplicadas de forma simultánea, separada o secuencial.

10

15

20

Fig. 1



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CU 03/00019

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K39/00 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 894 018 A (GANDOLF GILDA NUREZ ET AL) 13 April 1999 (1999-04-13) the whole document	1-8
A	GB 2 228 262 A (NAT INST IMMUNOLOGY) 22 August 1990 (1990-08-22) abstract	1-8
A	WO 94/10202 A (GENENTECH INC) 11 May 1994 (1994-05-11) the whole document	1
A	WO 02/45738 A (ALVAREZ ACOSTA ANABEL ;CT DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CU); GUILLÉN N) 13 June 2002 (2002-06-13) the whole document	1-8

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 2004

Date of mailing of the international search report

18. 05. 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

A.Martin-Falquina Garr

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CU 03/00019

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98/27111 A (BASULTO BAKER ROBERTO ;BRINGAS PEREZ RICARDO (CU); FUENTE GARCIA J) 25 June 1998 (1998-06-25) the whole document ---	1-8
A	CAMBY I ET AL: "CHARACTERIZATION OF THE INFLUENCE OF ANTI-HORMONE AND/OR ANTI-GROWTH FACTOR NEUTRALIZING ANTIBODIES ON CELL CLONE ARCHITECTURE AND THE GROWTH OF HUMAN NEOPLASTIC ASTROCYTIC CELL LINES" JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY, KLUWER, BOSTON, US, vol. 20, no. 1, 1994, pages 67-80, XP000618456 ISSN: 0167-594X the whole document -----	1-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CU 03/00019

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7 and 8  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 7 and 8 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 1  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1

Present claim 1 is considered not to be clear within the meaning of Art. 6 PCT. The expressions "analogues of GnRH", "analogues of gonadotropins", "derivatives peptides" and "mimetic peptides" do not allow the reader to determine which analogue or derivative to which the claim refers.

Further, present claim 1 relate to an extremely large number of possible therapeutic combinations. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the therapeutic combinations claimed.

In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the therapeutic combinations D3-1 + hEGFr-P64 and D3-1 + hVEGF-KLH which appear in the examples and whose synergistic effect has been demonstrated in Table 1

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CU 03/00019

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5894018	A	13-04-1999	CA 2137639 A1	10-06-1995
			CA 2261433 A1	10-06-1995
			EP 0657175 A2	14-06-1995
			JP 2823519 B2	11-11-1998
			JP 7285883 A	31-10-1995
-----				
GB 2228262	A	22-08-1990	NONE	
-----				
WO 9410202	A	11-05-1994	CA 2145985 A1	11-05-1994
			CZ 291047 B6	11-12-2002
			HU 70810 A2	28-11-1995
			WO 9410202 A1	11-05-1994
			AT 215565 T	15-04-2002
			AU 687727 B2	05-03-1998
			AU 2928992 A	24-05-1994
			BG 99605 A	29-02-1996
			BR 9207175 A	12-12-1995
			CZ 9501057 A3	13-12-1995
			DE 69232539 D1	08-05-2002
			DE 69232539 T2	21-11-2002
			DK 666868 T3	29-07-2002
			EP 0666868 A1	16-08-1995
			ES 2173873 T3	01-11-2002
			FI 951987 A	26-04-1995
			JP 3398382 B2	21-04-2003
			JP 8502514 T	19-03-1996
			NO 951609 A	27-04-1995
			SK 55195 A3	09-08-1995
-----				
WO 0245738	A	13-06-2002	AU 2152002 A	18-06-2002
			BR 0116017 A	13-01-2004
			CA 2430621 A1	13-06-2002
			CN 1482916 T	17-03-2004
			WO 0245738 A2	13-06-2002
			EP 1339425 A2	03-09-2003
			US 2003054011 A1	20-03-2003
-----				
WO 9827111	A	25-06-1998	AU 736538 B2	02-08-2001
			AU 5397598 A	15-07-1998
			BR 9713735 A	28-03-2000
			CA 2275440 A1	25-06-1998
			WO 9827111 A1	25-06-1998
			EP 0959079 A1	24-11-1999
			KR 2000057647 A	25-09-2000
-----				

# INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CU 03/00019

## A. CLASIFICACION DE LA INVENCIÓN

CIP 7 A61K39/00 A61K39/395

Según la clasificación internacional de patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP 7 A61K C07K

Otra documentación consultada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos forman parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, y cuando sea aplicable, términos de búsqueda utilizados)

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría*	Identificación del documento, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	US 5 894 018 A (GANDOLF GILDA NUREZ ET AL) 13 Abril 1999 (1999-04-13) el documento completo	1-8
A	GB 2 228 262 A (NAT INST IMMUNOLOGY) 22 Agosto 1990 (1990-08-22) resumen	1-8
A	WO 94/10202 A (GENENTECH INC) 11 Mayo 1994 (1994-05-11) el documento completo	1
A	WO 02/45738 A (ALVAREZ ACOSTA ANABEL ; CT DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CU); GUILLÉN N) 13 Junio 2002 (2002-06-13) el documento completo	1-8
	--- -/-	

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan documentos adicionales

☒ Véase el Anexo de la familia de patentes.

### \* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica, no considerado como particularmente pertinente

"E" documento anterior, publicado ya sea en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a la misma

"L" documento que puede plantear dudas sobre reivindicación(es) de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la especificada)

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a un empleo, a una exposición o a cualquier otro tipo de medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud, pero que se cita para comprender el principio o la teoría que constituye la base de la invención

"X" documento de particular importancia; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implique actividad inventiva cuando se considera el documento aisladamente

"Y" documento de especial importancia; no puede considerarse que la invención reivindicada implique actividad inventiva cuando el documento esté combinado con otro u otros documentos, cuya combinación sea evidente para un experto en la materia

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes

Fecha en la que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

26 Marzo 2004

Fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional

18. 05. 2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

A.Martin-Falquina Garr

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 03/00019

## C.(continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS PERTINENTES

Categoría°	Identificación de los documentos citados, con indicación, cuando se adecuado, de los pasajes pertinentes	N° de las reivindicaciones pertinentes
A	<p>WO 98/27111 A (BASULTO BAKER ROBERTO ;BRINGAS PEREZ RICARDO (CU); FUENTE GARCIA J) 25 Junio 1998 (1998-06-25) el documento completo</p>	1-8
A	<p>--- CAMBY I ET AL: "CHARACTERIZATION OF THE INFLUENCE OF ANTI-HORMONE AND/OR ANTI-GROWTH FACTOR NEUTRALIZING ANTIBODIES ON CELL CLONE ARCHITECTURE AND THE GROWTH OF HUMAN NEOPLASTIC ASTROCYTIC CELL LINES" JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY, KLUWER, BOSTON, US, vol. 20, num. 1, 1994, páginas 67-80, XP000618456 ISSN: 0167-594X el documento completo -----</p>	1-8

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ CU 2003/000019

## Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°s: 7 y 8  
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:  
Se refieren a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano. A pesar de ello, la búsqueda se ha realizado para estas reivindicaciones y se ha basado en los efectos atribuidos a las combinaciones descritas.
2. ☒ Las reivindicaciones n°s: 1  
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:  
Ver hoja adicional
3. ☐ Las reivindicaciones n°s:  
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

## Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la reserva

- ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.

## INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ CU 2003/000019

### Continuación del Recuadro I.2.

Se considera que según el Art. 6 PCT la reivindicación 1 no está clara. Las expresiones "análogos de GnRH", "análogos de gonadotropinas", "péptidos derivados" y "péptidos miméticos" no permiten determinar de qué análogo o derivado se trata. Además, la citada reivindicación 1 se refiere a un número extremadamente elevado de posibles combinaciones terapéuticas, lo que da lugar a una falta de claridad (y/o de concisión) que hace imposible la realización de una búsqueda completa. Consecuentemente, la búsqueda se ha llevado a cabo para aquellas partes de la reivindicación que parecen estar claras, fundadas y descritas, a saber, las combinaciones terapéuticas D3-1 + hEGFr-P64 y D3-1+hVEGF-KLH que aparecen en los ejemplos y cuyo efecto sinérgico se prueba experimentalmente en la tabla 1.

Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que de acuerdo con la Regla 66.1(e) PCT, no será necesario proceder a un examen preliminar internacional para las reivindicaciones o parte de ellas para las que no se haya establecido un informe de búsqueda internacional.

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre miembros de la familia de patentes

Solicitud Internacional N°

PCT/CU 03/00019

Documento de patente citado en el informe de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
US 5894018	A	13-04-1999	CA	2137639 A1	10-06-1995
			CA	2261433 A1	10-06-1995
			EP	0657175 A2	14-06-1995
			JP	2823519 B2	11-11-1998
			JP	7285883 A	31-10-1995
-----					
GB 2228262	A	22-08-1990	NINGUNO		
-----					
WO 9410202	A	11-05-1994	CA	2145985 A1	11-05-1994
			CZ	291047 B6	11-12-2002
			HU	70810 A2	28-11-1995
			WO	9410202 A1	11-05-1994
			AT	215565 T	15-04-2002
			AU	687727 B2	05-03-1998
			AU	2928992 A	24-05-1994
			BG	99605 A	29-02-1996
			BR	9207175 A	12-12-1995
			CZ	9501057 A3	13-12-1995
			DE	69232539 D1	08-05-2002
			DE	69232539 T2	21-11-2002
			DK	666868 T3	29-07-2002
			EP	0666868 A1	16-08-1995
			ES	2173873 T3	01-11-2002
			FI	951987 A	26-04-1995
			JP	3398382 B2	21-04-2003
			JP	8502514 T	19-03-1996
			NO	951609 A	27-04-1995
			SK	55195 A3	09-08-1995
-----					
WO 0245738	A	13-06-2002	AU	2152002 A	18-06-2002
			BR	0116017 A	13-01-2004
			CA	2430621 A1	13-06-2002
			CN	1482916 T	17-03-2004
			WO	0245738 A2	13-06-2002
			EP	1339425 A2	03-09-2003
			US	2003054011 A1	20-03-2003
-----					
WO 9827111	A	25-06-1998	AU	736538 B2	02-08-2001
			AU	5397598 A	15-07-1998
			BR	9713735 A	28-03-2000
			CA	2275440 A1	25-06-1998
			WO	9827111 A1	25-06-1998
			EP	0959079 A1	24-11-1999
			KR	2000057647 A	25-09-2000
-----					